

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	Applicant's or agent's file reference 22491P WO
International application No. PCT/EP00/06832	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
International filing date (day/month/year) 17 July 2000 (17.07.00)	
Applicant KLIMANT, Ingo	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 14 February 2001 (14.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer G. Bähr Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

BEST AVAILABLE COPY

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 23 JUL 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 22491P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06832	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/58		
Anmelder PRESENS PRECISION SENSING GMBH et al		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.


2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 14/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 19.07.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Cuendet, P Tel. Nr. +49 89 2399 8690



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-27 ursprüngliche Fassung

1 eingegangen am 05/03/2001 mit Schreiben vom 05/03/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

1). **Präambel**

Im Stand der Technik waren lumineszierende Mikro- und Nanopartikel bekannt; s. D1: WO-A-99/06821, S.9.

2). **Punkt V.2.**

Mikro- und Nanopartikel gemäss Anspruch 1 werden in dem im Recherchenbericht genannten Stand der Technik (inkl. D1) jedoch nicht genannt, s. auch Analyse des Anmelders vom 4.2.01. Der nächstliegende Stand der Technik ist D1; D1 wird in der vorliegenden Beschreibung gewürdigt, s. S.2.

Neuheit: In D1 werden Materialien genannt, "die für Gase nicht zugänglich sind" (s.S.13, Z.3). Damit wird nicht bestätigt, dass "durch Einbau in ein Polymer" der Leuchtstoff gemäss D1 von den gasförmigen Parametern der Umgebung wirklich abschirmt war. Auch steht in D1 **nicht**, (s.D1, S.9, Z.8 plus in Abwesenheit eines Herstellungsverfahrens), dass der Leuchtstoff in diesen Mikro- und Nanopartikel abgeschirmt ist. Demnach scheinen der vorliegende Anspruch 1/die diesbezüglichen Verwendungs- und Herstellungsansprüche, neu zu sein.

Erfinderische Tätigkeit: In D1 sind die in der vorliegenden Anmeldung genannten Matrixmaterialien nicht genannt (s.Anmeldung S.6 und 7). Demnach konnten die lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel von D1 nicht, in naheliegender Weise, die beanspruchte Abschirmung implizieren.

3). **Punkt VIII.**

Der in den Ansprüchen 1 und 2 benutzte Ausdruck "im Wesentlichen" ist vage und unklar und lässt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

Kommentar: Der Ausdruck "gasförmigen" im Kontext des Anspruchs 1 scheint durch S.6, 2. Abschnitt, gestützt zu sein.

05. März 2001

Ansprüche

1. Lumineszierende Mikro- und Nanopartikel,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie lumineszierende Substanzen mit langen
Lumineszenzabklingzeiten enthalten und wobei die lumineszierenden
Substanzen gegenüber chemischen, biochemischen und gasförmigen
Parametern der Umgebung im Wesentlichen abgeschirmt sind.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/0315068

Applicant's or agent's file reference 22491P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06832	International filing date (day/month/year) 17 July 2000 (17.07.00)	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/58		
Applicant PRESENS PRECISION SENSING GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 14 February 2001 (14.02.01)	Date of completion of this report 19 July 2001 (19.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-18, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 2-27, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1, filed with the letter of 05 March 2001 (05.03.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Luminescent micro- and nanoparticles are known in the prior art (see Box VI). However, micro- and nanoparticles according to Claim 1 are not indicated in the prior art cited in the search report (including D1) (see also the applicant's analysis dated 4 February 2001). The closest prior art is D1; D1 is acknowledged in the present description (see page 2).

Novelty: In D1 are indicated materials "that are inaccessible to gases" (page 13, line 3). This does not confirm that "by incorporating in a polymer," the luminescent material according to D1 was actually shielded from the gaseous parameters of the environment. D1 also does **not** state (see D1, page 9, line 8 onward, in the absence of a production method) that the luminescent material in these micro- and nanoparticles is shielded. Thus the present Claim 1 and its associated use and production claims appear to be novel.

Inventive Step: The matrix materials indicated in the present application are not indicated in D1 (see application, pages 6 and 7). Thus the luminescent material micro- and nanoparticles in D1 could not suggest the claimed shielding in an obvious manner.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.

Preamble:

Luminescent micro- and nanoparticles were indicated in the prior art (see D1: WO-A-99/06821, page 9).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "essentially," which is used in Claims 1 and 2, is vague and unclear and leaves the reader uncertain of the significance of the technical feature to which it refers. As a result, the definition of the subject matter of these claims is not clear (PCT Article 6).

Commentary: The expression "gaseous" in the context of Claim 1 appears to be supported by page 6, second paragraph.

NK

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 22491P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/06832	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/07/2000
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1999	
Anmelder PRESENS PRECISION SENSING GMBH	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. --



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/58 G01N33/96

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 06821 A (KLIMANT INGO) 11. Februar 1999 (1999-02-11) in der Anmeldung erwähnt Seite 8, Zeile 18 -Seite 9, Zeile 22 Seite 14, Zeile 5 - Zeile 17 ---	1-7, 11-13,22
X	WO 95 14928 A (SYNTEX INC) 1. Juni 1995 (1995-06-01) Ansprüche 1,3 ---	1-5, 8-10,14, 15, 19-21,23
X	GB 2 132 348 A (UNIV VIRGINIA) 4. Juli 1984 (1984-07-04) Ansprüche 5,9,11-14 --- -/--	1-5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 379 (C-463), 10. Dezember 1987 (1987-12-10) & JP 62 148580 A (TOAGOSEI CHEM IND CO LTD;OTHERS: 01), 2. Juli 1987 (1987-07-02) Zusammenfassung ---	1,2, 8-10,14, 19-21
P,X	HUBER, CHRISTIAN ET AL: "Optical sensor for seawater salinity" FRESENIUS' J. ANAL. CHEM. (2000), 368(2-3), 196-202 , XP000974975 das ganze Dokument ---	1-27
P,X	LIEBSCH, GREGOR ET AL: "Luminescence lifetime temperature sensing based on sol -gels and poly (acrylonitrile)s dyed with ruthenium metal-ligand complexes" ADV. MATER. (WEINHEIM, GER.) (1999), 11(15), 1296-1299 , XP000971460 das ganze Dokument ---	1-5,8-24
A	WO 96 21154 A (IGEN INC) 11. Juli 1996 (1996-07-11) Seite 16, Zeile 9 -Seite 17, Zeile 22; Beispiele A,B -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06832

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906821	A	11-02-1999	DE 19829657 A EP 1000345 A	04-02-1999 17-05-2000
WO 9514928	A	01-06-1995	US 5578498 A CA 2177143 A EP 0730738 A JP 9505888 T US 5536834 A US 5811311 A US 5780646 A	26-11-1996 01-06-1995 11-09-1996 10-06-1997 16-07-1996 22-09-1998 14-07-1998
GB 2132348	A	04-07-1984	CA 1261717 A DE 3346810 A FR 2538550 A JP 1933506 C JP 6043963 B JP 59170748 A US 5030420 A	26-09-1989 26-07-1984 29-06-1984 26-05-1995 08-06-1994 27-09-1984 09-07-1991
JP 62148580	A	02-07-1987	JP 5064671 B	16-09-1993
WO 9621154	A	11-07-1996	AU 4756296 A	24-07-1996

Claims

AMENDED CLAIMS

5 [filed at the International Bureau on February 24, 2001
(02.24.01); original claims 1-27 replaced by
amended claims 1-27 (6 pages)]

- 10 2. The particle as claimed in claim 1,
characterized in that
one or more luminescence properties of said
luminescent substances, which are in particular
selected from the group consisting of quantum
15 yield, spectral characteristics, luminescence
decay time and anisotropy, are essentially
independent of the particular environment.

CLAIM 1

- A 20 3. The particle as claimed in ~~claim 1 or 2~~,
characterized in that
the luminescent substances are metal/ligand
complexes of ruthenium(II), osmium(II) rhenium(I),
iridium(III) platinum(II) and palladium(II) as
central atom.

- 25 4. The particle as claimed in claim 3,
characterized in that
the luminescent substances are complexes with 2-
or 3-dentate polypyridyl ligands such as 2,2'-
bipyridine, bipyrazine, phenanthroline, terpyridyl
30 or derivatives thereof as ligands.

CLAIM 3

- A 35 5. The particle as claimed in ~~either of claims 3 or 4~~,
characterized in that
the luminescent compounds are the tris complexes
of ruthenium(II) with 2,2'-bipyridyl, 1,10-
phenanthroline, 4,4-diphenyl-2,2'-bipyridyl and
4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline as ligands.

A 6. The particle as claimed in ~~claim 1 or 2~~,
characterized in that
the luminescent substances are carbonyl complexes
of Re(I) with additional diimine ligands such as
5 derivatives of 2,2'-bipyridyl and 1,10-
phenanthroline.

CLAIM 1

A 7. The particle as claimed in ~~claim 1 or 2~~,
characterized in that
10 the luminescent compounds are porphyrin complexes
of Pt(II) and Pd(II) as central atoms.

CLAIM 1

8. The particle as claimed in ~~any of claims 1-7~~,
characterized in that
15 it contains an organic polymer which distinguishes
itself by low absorption of water or/and minimum
gas permeability.

9. The particle as claimed in claim 8,
20 characterized in that
it contains an organic polymer from the group
consisting of polyacrylonitrile, poly(meth)acrylic
copolymers, polyvinyl chlorides or polyvinylidene
chlorides and copolymers thereof.

25 10. The particle as claimed in claim 9,
characterized in that
it contains polyacrylonitrile or polyacrylonitrile
copolymers, in particular copolymers with acrylic
30 acid, acrylic amines or/and acrylic esters.

CLAIM 1

11. The particle as claimed in ~~any of claims 1-7~~,
characterized in that
it contains a glass which is essentially free of
35 micropores.

12. The particle as claimed in claim 11,
characterized in that

it contains a glass which has been produced according to a sol/gel process.

CLAIM 11

- A 13. The particle as claimed in ~~claim 11 or 12~~,
5 characterized in that
it contains a sol/gel glass which has been prepared from silicon, titanium, zirconium or/and tin tetraalcoholates.

CLAIM 12

- A 14. The particle as claimed in ~~any of claims 1 - 13~~,
10 characterized in that
its surface has been modified by reactive groups such as amino, epoxy, hydroxyl, thiol or/and carboxyl groups which make possible the covalent
15 coupling of luminescent indicators or/and biomolecules.

15. The particle as claimed in claim 14,
characterized in that
20 it contains luminescent indicators or/and biomolecules covalently coupled to its surface.

- A 16. A method for preparing luminescent micro- and
nanoparticles as claimed in ~~any of claims 8 - 10~~,
25 wherein the particles are precipitated from a polymer solution in which the luminescent compound is present in soluble form by adding a liquid dropwise, with the liquid being miscible with the polymer solvent but causing a reduction in the
30 solubility of the polymer.

17. The method as claimed in claim 15, wherein the
particles are precipitated from a solution comprising dimethylformamide and polyacrylonitrile
35 or polyacrylonitrile copolymer, in which the luminescent compound is present in soluble form, by adding water or an aqueous solution dropwise.

CLAIM 16

18. The method as claimed in claim ~~16~~ or ~~17~~, wherein the particle diameter is adjusted by varying the polymer content of the solution.

19. A method for preparing luminescent micro- and nanoparticles as claimed in ~~any of claims 8-10~~, wherein the luminescent compound is incorporated by diffusion from a solvent (mixture) into already prefabricated particles.

20. A method for preparing luminescent micro- and nanoparticles as claimed in ~~any of claims 8-10~~, wherein the particles are formed by spraying a polymer solution in which the luminescent compound is present in soluble form and evaporation of the solvent.

21. The method as claimed in claim 20, wherein the particle diameter is adjusted by varying the polymer content of the spray solution.

22. A method for preparing luminescent microparticles as claimed in ~~any of claims 11-13~~, wherein the luminescent compound is incorporated into compressed monolithic sol/gel glasses which are subsequently ground and fractionated according to size.

23. The use of the luminescent micro- and nanoparticles as claimed in ~~any of claims 1-14~~ for labeling and luminometric detection of biomolecules from the group consisting of toxins, hormones, hormone receptors, peptides, proteins, lectins, oligonucleotides, nucleic acids, antibodies, antigens, viruses and bacteria.

24. The use of the luminescent micro- and nanoparticles as claimed in ~~any of claims 1-14~~

as reference standards of fluorescence intensity signals in fluorimetric assays.

5 25. The use as claimed in claim 23, wherein addition of the standard to the sample converts the intensity information into a phase signal or/and a time-dependent parameter.

A 10 26. The use of the luminescent ^{micro-} and nanoparticles as claimed in any of ~~claims 1-14~~ ^{CLAIM 2} for referencing the luminescence intensity signal of optical luminescence sensors, wherein the particles are immobilized to a solid phase together with a luminescent indicator.

15 27. A method for luminometric determination of a biochemical or chemical parameter using two different luminescent dyes which have different decay times and the time or phase characteristics of the resulting luminescent response are used for generating a reference parameter for determination of said parameter, with the first luminescent dye corresponding to said parameter at least with respect to luminescence intensity and the second one not corresponding to said parameter at least with respect to luminescence intensity and luminescence decay time

25 characterized in that the second luminescent dye is ^{CLAIM 2} used in the form of particles as claimed in any of ~~claims 1-15~~.

A 30

Add
B2

Add
B3
Abstract

107031506

- 19 - 531 Rec'd PCT/F 15 JAN 2002

Claims

1. A luminescent micro- or nanoparticle,
characterized in that
- 5 it contains luminescent substances having long
luminescence decay times and said luminescent
substances are essentially shielded from ambient
chemical, biochemical and gaseous parameters.

107031506

*For
an*

RA

10/031506

531 Rec'd PCT/PTO 15 JAN 2002

- 1 -

Herstellung und Anwendung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln mit langlebiger Lumineszenz. Diese Partikel können entweder als interne Standards zur Referenzierung von Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzsignalen (Lumineszenzsignalen) oder als Marker zur Markierung und Detektion von Biomolekülen verwendet werden. Langlebige Lumineszenzfarbstoffe werden in inerte Form in feste Materialien eingebaut, das heißt vom Einfluß chemischer und biologischer Substanzen in gasförmigen und wässrigen Proben abgeschirmt. In dieser eingebauten Form bleiben die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe (spektrale Charakteristik, Lumineszenzabklingzeit und Lumineszenzanisotropie) von wechselnden Probenparametern unbeeinflusst.

15

20

25

Als Einbaumatrix werden insbesondere dichte anorganische Materialien oder organische Polymere ausgewählt, die aufgrund ihrer Struktur die Aufnahme von Biomolekülen kleinen neutralen Molekülen sowie ionischen Substanzen ausschließen. Insbesondere der störende Einfluß von molekularem Sauerstoff, einem effizienten Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlöcher, auf die Lumineszenzmessungen wird auf diese Weise ausgeschlossen bzw. stark reduziert. Die Oberfläche der Nano- und Mikropartikel kann mit reaktiven chemischen Gruppen versehen sein, um die kovalente Kopplung von Biomolekülen oder/und lumineszierenden Indikator-Farbstoffen zu ermöglichen. Ferner kann die Oberfläche mit chemischen Gruppen versehen sein, um das Aggregieren der Partikel zu verhindern.

30

Die Messung der Lumineszenz ist eine weit verbreitete Methode in der Bio- und Chemoanalytik. Ihre Attraktivität verdankt sie ihrer hohen

- 2 -

Empfindlichkeit, der Vielseitigkeit sowie der Eliminierung der Strahlenbelastung durch radioaktive Markierungsreagenzien. In der Praxis werden in der Regel Lumineszenzmarker, die sich durch eine hohe Quantenausbeute auszeichnen, eingesetzt. Meist wird die Lumineszenzintensität des Lumineszenzmarkers mit dem zu bestimmenden Parameter der Probe korreliert. Nachteilig wirkt sich bei solchen Bestimmungsmethoden aus, daß die quantitative Auswertung der Lumineszenzintensität durch eine Vielzahl von Faktoren gestört wird. Dabei kann es sich zum einen um Schwankungen im optischen System (Strahlungsintensität der Lichtquelle, Empfindlichkeit des Detektors und Transmission des optischen Weges) aber auch um intrinsische optische Eigenschaften der Probe (Färbung oder Trübung) handeln.

Um diese Störeinflüsse zu eliminieren bzw. zu vermindern, benötigt man geeignete Methoden zur Referenzierung der Lumineszenzsignale. Eine in WO99/06821 (Klimant) beschriebene Methode zum Referenzieren von Lumineszenzsignalen beruht darauf, daß zur Probe ein lumineszierender Referenzfarbstoff zugegeben wird, der ähnliche (im besten Fall identische) spektrale Eigenschaften wie der eigentliche Lumineszenzmarker aufweist. In Kombination mit einer Frequenzmodulations- oder zeitaufgelösten Lumineszenzmessung wird auf diese Weise die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter umgewandelt. Um auf diese Weise eine fehlerfreie Referenzierung des Meßsignals zu realisieren, werden inerte lumineszierende Referenzstandards benötigt, deren Lumineszenzeigenschaften von den Probenparametern nicht beeinflußt werden. Dafür kommen zum Beispiel phosphoreszierende anorganische Feststoffe wie zum Beispiel mit Cr(III) dotierte Mischoxide in Frage, die in gepulverter Form der Probe zugemischt werden können. Andererseits können hierzu auch langlebige Lumineszenzfarbstoffe in Träger aus organischen oder anorganischen Materialien eingebaut und der Probe zugemischt werden.

Eine weitere Art der Störung der quantitativen Auswertung von Fluoreszenzintensitätssignalen ist das Auftreten von Eigenfluoreszenz in der Probe. Insbesondere natürliche Proben wie Blut oder Serum können eine Vielzahl an fluoreszierenden Substanzen aufweisen. Ist die Signalintensität des fluorimetrischen Assays sehr gering, kann durch Eigenfluoreszenz die Messung sogar unmöglich sein. Ein verbreitete Methode um das eigentliche Lumineszenzsignal vom unspezifischen Untergrundsignal abzutrennen besteht darin, langlebig emittierende Lumineszenzfarbstoffe als Marker zu verwenden. Mit Hilfe zeitaufgelöster Lumineszenztechniken ist es möglich, das verzögerte Meßsignal zeitlich von der kurzlebigen Untergrundfluoreszenz zu trennen. Für diese Methode werden hauptsächlich phosphoreszierende Chelate der Seltenerdenmetalle (insbesondere die des Europium oder Terbium) eingesetzt. Diese Farbstoffe besitzen aber den Nachteil, dass sie nur mit UV-Lichtquellen angeregt werden können. Außerdem sind die verwendeten Chelate in gelöster Form in wässrigen Systemen häufig instabil, d.h. es kommt zu Ligandenverlust. Als langlebige Marker kommen potentiell aber auch lumineszierende Metall-Ligand-Komplexe, insbesondere mit Ruthenium(II) als Zentralatom in Frage. Werden diese Farbstoffe in gelöster Form wässrigen Systemen zugegeben, wird deren Lumineszenz in der Regel durch molekularen Sauerstoff, starke Oxidationsmittel oder Reduktionsmittel gelöscht.

Weiterhin können auch Lumineszenzindikatoren, beispielsweise zur Bestimmung des pH-Werts, der Konzentration bzw. Aktivität von Ionen oder kleinen Molekülen, eingesetzt werden, deren Lumineszenzintensität durch direkte oder indirekte Wechselwirkung mit dem zu bestimmenden Parameter, z.B. durch Reaktion mit einem Analyten oder als Transducer, von der Konzentration bzw. Aktivität des zu bestimmenden Parameters, z.B. eines Analyten oder des pH-Werts, abhängt.

Für alle genannten Methoden ist es unbedingt notwendig, daß die photophysikalischen Eigenschaften des Lumineszenzfarbstoffs nicht von den

Probenparametern beeinflußt werden. Werden solche Farbstoffe der Probe im gelösten Zustand zugegeben oder mit der Probe in zumindest indirekten Kontakt gebracht, sind diese Voraussetzungen nicht gegeben. Insbesondere Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlöschungen durch molekularen Sauerstoff sowie oxidative und reduktive Löscher bewirken Fehlinterpretationen des Meßsignals.

Um inerte langlebige Lumineszenzmarker und Lumineszenzfarbstoffe zur Referenzierung der Lumineszenzintensität von Lumineszenzindikatoren zur Verfügung zu haben, müssen die Lumineszenzfarbstoffe in feste Materialien eingebaut werden, damit sie mit der Probe nicht in Wechselwirkung treten können.

Die vorliegende Anmeldung beschreibt sowohl neue lumineszierende Mikro- und Nanopartikel, deren lumineszenze Eigenschaften nicht oder nur gering von der Zusammensetzung der Probe abhängen, als auch Verfahren zu deren Herstellung. Es werden außerdem Anwendungsmöglichkeiten der in Form von Nano- und Mikropartikeln vorliegenden Lumineszenzmarker bzw. Lumineszenzfarbstoffe zur Referenzierung der Lumineszenzintensität von Lumineszenzindikatoren beschrieben.

Ein Gegenstand der Anmeldung sind daher lumineszierende, insbesondere phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel, die lumineszierende Substanzen, z.B. Metall-Liganden-Komplexe mit langen Lumineszenzabklingzeiten in einer festen Matrix enthalten, so dass sie gegenüber chemischen Parametern der Umgebung, z.B. einer Probe, abgeschirmt sind und deren Lumineszenzeigenschaften wie etwa Quantenausbeute, spektrale Eigenschaften, Lumineszenzabklingzeit oder/und Anisotropie von der jeweiligen Umgebung, z.B. der jeweiligen Probenzusammensetzung, im Wesentlichen unabhängig sind.

"Unabhängig" im Sinne der gegenständlichen Anmeldung bedeutet, dass die Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit und ggf. weiterer Lumineszenzeigenschaften vom pO_2 und ggf. anderen störenden Substanzen der Umgebung der in den erfindungsgemäßen Partikeln vorliegenden Lumineszenzfarbstoffe, welche sich in zumindest in indirektem Kontakt mit der Probe befinden, geringer ist als die Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit und ggf. weiteren Lumineszenzeigenschaften der entsprechenden Farbstoffe, welche sich, ohne die erfindungsgemäße Abschirmung, in zumindest indirektem Kontakt mit der Probe befinden.

Vorzugsweise ist die Lumineszenzabklingzeit der in den erfindungsgemäßen Partikeln vorliegenden Lumineszenzfarbstoffe in luftgesättigter Umgebung um höchstens 20%, besonders bevorzugt um höchstens 15% und am meisten bevorzugt um höchstens 10% geringer als in O_2 -freier Umgebung, jeweils bei Raumtemperatur. Ohne Abschirmung wird hingegen eine Abnahme der Lumineszenzabklingzeit um deutlich mehr als 80% in luftgesättigter Umgebung gegenüber einer O_2 -freien Umgebung gefunden.

Die lumineszierenden Metall-Liganden-Komplexe sind vorzugsweise Verbindungen von Übergangsmetallen wie Ruthenium(II), Osmium(II), Rhenium(I), Iridium(III), Platin(II) und Palladium(II) als Zentralatom. Die Komplexliganden werden vorzugsweise aus zwei- oder/und dreizähnigen Liganden mit N-Heterozyklen, beispielsweise Polypyridyl-Liganden wie etwa 2,2'-Bipyridin, Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridil oder deren Abkömmlingen ausgewählt. Besonders bevorzugte Beispiele von Metall-Liganden-Komplexen sind die Triskomplexe von Ruthenium(II) mit 2,2'-Bipyridyl, 1,10-phenanthrolin, 4,4-Diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin als Liganden. Weiterhin besonders bevorzugt sind Carbonylkomplexe von Re(I) mit zusätzlichen Poly-N-heterozyklischen Liganden wie etwa 2,2'-Bipyridyl und 1,10-phenanthrolin oder Abkömmlingen davon. Ebenfalls bevorzugt sind als Metall-Liganden-Komplexe die Porphyrinkomplexe von Pt(II) oder Pd(II) als Zentralatom, die sich durch intensive Phosphoreszenz bei Raumtemperatur auszeichnen. Die

Lumineszenzabklingzeiten der Verbindungen betragen vorzugsweise ≥ 100 Nanosekunden, besonders bevorzugt ≥ 400 Nanosekunden. Erfindungsgemäß können auch Seltenerdmetalle wie beispielsweise die Lanthaniden Tb(III) oder Eu(III) oder andere Substanzen als langlebige
5 Lumineszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

Die lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel haben vorzugsweise eine mittlere Größe im Bereich von 20 nm bis 10 μm , besonders bevorzugt von 50 nm bis 1 μm . Die lumineszierenden Verbindungen werden in Materialien
10 eingebaut, die sich durch geringe Permeabilität (d.h. geringe Diffusionskonstanten und geringe Löslichkeit) für Wasser, löschende gasförmige Substanzen (z.B. O_2) und Störsubstanzen auszeichnen. Beispiele für geeignete Materialien sind nichtporöse Gläser, insbesondere Gläser, die nach einem Sol-Gel-Verfahren beispielsweise aus Silizium-, Titan-,
15 Zirkonium- oder Zinn-enthaltenden Verbindungen, z.B. Alkoholaten wie etwa Zinntetraalkoholaten hergestellt wurden.

Die Herstellung solcher Gläser nach Standardmethoden führt zu Materialien, die durch eine mikroporöse Struktur gekennzeichnet sind. Eingebaute
20 Lumineszenzfarbstoffe sind damit für gelöste Probenbestandteile und insbesondere Sauerstoff zugänglich und können damit gelöscht werden. Die in dieser Erfindung beschriebenen Sol-Gläser werden aus diesem Grund durch Erhitzen auf eine erhöhte Temperatur von z.B. 200°C in einem besonderen Schritt der Herstellung verdichtet. Nach der Hydrolyse des Sol-
25 Gel-Precursors, z.B. Tetramethoxysilan, wird unter Vakuum das Lösungsmittel abgezogen und das Sol-Gel noch vor der endgültigen Vernetzung getrocknet. Auf diese Weise entsteht eine dichte nichtporöse Glasmatrix. Biomoleküle sowie chemische Verbindungen können in diese dichte Matrix nicht eindringen und beeinflussen damit nicht die
30 Lumineszenzeigenschaften der eingebauten Farbstoffe. Es wurden inerte phosphoreszierende Sol-Gel Gläser mit den Farbstoffen Ruthenium(II)-tris-1,10-phenanthrolin sowie Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin

mit Farbstoffgehalten bis zu 40 mM (bezogen auf kg SiO₂) nach diesem Verfahren hergestellt. Diese Materialien zeichnen sich durch intensive Raumtemperaturlumineszenz aus, die durch Sauerstoff nicht gelöscht wird. Da im Herstellungsprozess die Sol-Gel-Phosphore entweder in monolithischer Form oder als dünne Filme entstehen, müssen Mikropartikel durch Pulverisieren hergestellt werden. Anschließend Silanisierung der Partikel führt zu reaktiven Oberflächen, die zum kovalenten Koppeln von Lumineszenzindikatoren oder Biomolekülen genutzt werden können. Die Oberfläche der Partikel kann hierzu beispielsweise mit Amino-, Epoxy-, Hydroxyl-, Thiol- oder/und Carboxylgruppen versehen werden.

Eine Alternative zur Herstellung von inerten Lumineszenzpartikeln besteht darin, organische Polymere als Einbettungsmatrix zu verwenden, die sich zum einen durch eine sehr geringe Gaspermeabilität (zum Ausschluss von Sauerstoff) und zum anderen durch eine minimale Wasseraufnahme (um das Eindringen ionischer Verbindungen zu verhindern) auszeichnen. Geeignete Polymere sind Polyvinylchlorid, Polyvinylidenchlorid, Poly(meth)acrylpolymere und insbesondere Polyacrylnitril sowie Copolymere davon.

Polyacrylnitril (PAN) besitzt eine extrem geringe Gaspermeabilität, teilweise hydrophile Eigenschaften und eine sehr geringe Aufnahmekapazität für Wasser (ca. 2%). Außerdem können die an der Oberfläche befindlichen Nitrilgruppen der Polymerpartikel beispielsweise zu Carboxylgruppen oder/und Amidgruppen verseift bzw. zu Amingruppen umgesetzt werden, die dann für die kovalente Bindung von diversen Biomolekülen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist Polyacrylnitril die optimale Einbettungsmatrix für Lumineszenzfarbstoffe als Basis für inerte Nano- und Mikropartikel.

Weiterhin können auch Polyacrylnitril-Copolymere oder Mischpolymere mit Polyacrylnitril eingesetzt werden, d.h. Polymere, die Acrylnitril und

zusätzlich ein oder mehrere Monomere enthalten, insbesondere Polyacrylnitril-Co- oder Mischpolymere mit einem PAN-Gewichtsanteil von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 70% und besonders bevorzugt mindestens 90%. Ein Copolymer enthält PAN und ein Comonomer in einer Polymerkette. Ein Mischpolymer enthält eine PAN bzw. PAN-Copolymerkomponente in einer Polymerkette und mindestens eine Nicht-PAN-Komponente in einer anderen Polymerkette. Geeignete zusätzliche Monomere für Copolymere und Mischpolymere sind Monomere mit hydrophilen oder/und reaktiven Gruppen z.B. Acrylsäure, Acrylamine und Acrylester, z.B. Polyethylenglykol-Acrylester oder Gemische davon. Dabei können sich die hydrophilen Gruppen bevorzugt auf der Partikeloberfläche anreichern. Die an der Oberfläche befindlichen hydrophilen oder/und reaktiven Gruppen können dann zur Kopplung von Bindepartnern wie Biomolekülen oder lumineszierenden Indikatormolekülen verwendet werden. Weiterhin können diese Gruppen auch zur Vermeidung der Aggregation von Partikeln beitragen.

Die Herstellung lumineszierender Mikro- und Nanopartikel auf der Basis von Polyacrylnitril (PAN) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

- 20 A. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN bzw. einem PAN-Copolymer oder Mischpolymer in einem organischen Lösungsmittel(gemisch), z.B. Dimethylformamid durch kontrolliertes Zutropfen von Wasser, wässrigen Lösungen, z.B. einer NaCl-Lösung, oder anderen Flüssigkeiten, die mit dem Polymerlösungsmittel mischbar sind, jedoch eine Verringerung der Löslichkeit und somit eine Ausfällung des Polymers mit dem Lumineszenzfarbstoff bewirken. Die Polymerlösung enthält gleichzeitig den gelösten Lumineszenzfarbstoff. Diese Verfahrensvariante ist besonders einfach und daher bevorzugt.
- 30 B. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN bzw. einem PAN-Copolymer oder Mischpolymer in einem organischen Lösungsmittel(gemisch), z.B. Dimethylformamid, durch kontrolliertes

Zutropfen von Wasser, wässrigen Lösungen, z.B. einer NaCl-Lösung, oder anderen Flüssigkeiten, die mit dem Polymerlösungsmittel mischbar sind, jedoch eine Ausfällung des Polymers bewirken. Die Polymerlösung enthält keinen gelösten Lumineszenzfarbstoff. Der Lumineszenzfarbstoff wird nachträglich durch Diffusion in die Partikel eingetragen.

- C. Herstellung der Partikel durch Sprühen einer Lösung von PAN bzw. einem PAN-Copolymer oder Mischpolymer in einem organischen Lösungsmittel(gemisch), z.B. Dimethylformamid, die den Lumineszenzfarbstoff z.B. in Wasser oder Ethanol enthält, wobei das Lösungsmittel verdunstet.

In allen Vorschriften kann der Durchmesser der Partikel durch Veränderung des Anteils an Polymer in der Lösung gezielt eingestellt werden. Mit abnehmendem Anteil an Polymer reduziert sich auch der Durchmesser der Partikel.

Nach der Herstellung und Isolierung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel kann die Aktivierung der Oberfläche mit reaktiven Carboxylgruppen, z.B. durch Verseifung der oberflächengebundenen Nitrilgruppen in Base, z.B. konzentrierter Natronlauge, erfolgen. Die Carboxylgruppen werden aus zwei Gründen benötigt. Zum einen können so stabile Dispersionen in (pH-)gepufferten Systemen hergestellt werden und zum anderen können Biomoleküle und Lumineszenzindikatoren an der Oberfläche kovalent gebunden werden.

Erfindungsgemäße Partikel, deren Oberfläche durch reaktive Gruppen modifiziert ist, können zur kovalenten Kopplung von Lumineszenzindikatoren oder/und Biomolekülen eingesetzt werden. Bei den Lumineszenzindikatoren kann es sich um ähnliche Verbindungen handeln, wie sie in der Partikelmatrix eingeschlossen sind. Im Unterschied zu den eingeschlossenen lumineszierenden Verbindungen stehen die an die Oberfläche gekoppelten

Lumineszenzindikatoren mit der Umgebung in Kontakt, so dass sie auf chemische Umgebungsparameter reagieren können. Derart modifizierte Partikel können als Lumineszenzindikatoren mit interner Referenzierung eingesetzt werden. Andererseits oder zusätzlich können auch Biomoleküle
5 wie Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien an die Oberfläche der Partikel gekoppelt werden. Die Kopplung erfolgt über bekannte Methoden, z.B. unter Verwendung von bifunktionellen Linkermolekülen.

10

Außerdem können die Partikel als Standards zur Referenzierung von Lumineszenzintensitätssignalen in fluorometrischen Assays, z.B. bei der diagnostischen Bestimmung von Analyten, eingesetzt werden.

15

Die Mikro- und Nanopartikel können zum einen als lumineszierende Standards zur Konvertierung der Lumineszenzintensität von an der Oberfläche gebundenen bzw. in der Umgebung befindlichen Lumineszenzindikatoren in Phasensignale oder zeitabhängige Parameter (beispielsweise zur Referenzierung des Lumineszenzintensitätssignals von
20 optischen Lumineszenzsensoren, wobei die Partikel mit einem Lumineszenzindikator in einer festen Phase, wie in WO99/06821 (Klimant) beschrieben, gemeinsam immobilisiert werden) und zum anderen als Lumineszenzmarker für die hochempfindliche Detektion bzw. Bestimmung von Biomolekülen eingesetzt werden.

25

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur lumineszenzoptischen Bestimmung eines biochemischen oder chemischen Parameters unter Verwendung zweier verschiedener Lumineszenzfarbstoffe, die unterschiedliche Abklingzeiten aufweisen und das Zeit- oder
30 Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße für die Bestimmung des Parameters verwendet wird, wobei der erste Lumineszenzfarbstoff zumindest in der Lumineszenzintensität auf

den Parameter anspricht und der zweite zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit im Wesentlichen nicht auf den Parameter anspricht, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass der zweite Lumineszenzfarbstoff in Form von erfindungsgemäßen Partikeln eingesetzt wird. Als Referenzgröße wird vorzugsweise ein Verhältnis der beiden Lumineszenzintensitätsanteile verwendet, welches unabhängig von der Gesamtintensität des Lumineszenzsignals ist. Alternativ kann als Referenzgröße auch die Phasenverschiebung der Lumineszenzantwort des ersten Lumineszenzfarbstoffs zu der des zweiten Lumineszenzfarbstoffs verwendet werden. Außerdem kann als Referenzgröße auch die gemessene Phasenverschiebung des Summensignals aus dem Signal des ersten Lumineszenzfarbstoffs und dem verzögerten Referenzsignal des zweiten Lumineszenzfarbstoffs verwendet werden. Für weitere Einzelheiten des Verfahrens und einer zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Vorrichtung wird auf WO99/06821 verwiesen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert werden.

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von lumineszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und [Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin]²⁺

1 g n-Polyacrylnitril (Polysciences Inc., MW 150000) wird zusammen mit 10mg Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-perchlorat in 100 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung werden 400 ml H₂O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend werden 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigem Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich über

Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält den gesamten Farbstoff und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Lumineszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschrift in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag, der aus den Nanopartikeln besteht, wird abgetrennt und in 50 ml H₂O aufgenommen.

Beispiel 2

Herstellung von phosphoreszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und [Ruthenium(II)-tris-1,10 phenanthrolin]²⁺

1 g n-Polyacrylnitril wird zusammen mit 10 mg Ruthenium(II)-tris-1,10 phenanthrolin-hexafluorophosphat in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung werden 400 ml H₂O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend werden 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigen Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein Niederschlag, der sich über Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält ca. 90% des eingesetzten Farbstoffs und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Lumineszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschrift in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag (Nanopartikel) wird abgetrennt und in 50 ml H₂O aufgenommen.

Beispiel 3

Carboxylierung der Oberfläche der lumineszierenden Nanopartikel

10 ml der Partikelsuspension aus den Beispielen 1 oder 2 mit einem Feststoffgehalt von 200 mg Polyacrylnitril werden in 50 ml einer 5%igen NaOH-Lösung aufgenommen. Die Partikel fallen aus. Die Suspension wird
5 für 45 Minuten unter intensiven Rühren auf 75°C erhitzt. Intensiver Geruch nach Ammoniak zeigt die Verseifung der an den Oberflächen befindlichen Nitrilgruppen an. Nach Aufklaren der trüben Lösung wird die Natronlauge durch Zugabe von HCl neutralisiert und auf pH 3 eingestellt. Dabei fallen die
10 an der Oberfläche carboxylierten Partikel wiederum als Niederschlag aus und können abzentrifugiert werden. Abschließend werden sie in 50 ml Puffer pH 3 gewaschen, abzentrifugiert und in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen.

15 Auf analoge Weise kann die Verseifung auch in 8% NaOH bei 25°C für 24 h erfolgen.

Beispiel 4

Nanopartikel bestehend aus einem Copolymer aus 90% Polyacrylnitril und
20 10% Polyacrylsäure und [Ruthenium (II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin]²⁺

2 g eines selbstsynthetisierten Acrylnitril-Acrylsäure 10:1 Copolymers und 40 mg [Ruthenium (II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin]²⁺ als
25 Trimethylsilylpropansulfonat (Ru(dpphen)₃TMS₂) werden in 400 g DMF gelöst. Unter Rühren wird 1 l 10⁻³ N NaOH zugetropft und mit Wasser auf 2 l aufgefüllt. Die klare Suspension wird mit 0,1 N HCl auf pH 3 gebracht und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zentrifugat wird 3 mal mit je 1,8 l Wasser gewaschen und in 200 ml 50 mM Na₂HPO₄
30 mittels Ultraschall resuspendiert. Die klare Suspension wird 20 min auf ca 80°C erwärmt und nach dem Abkühlen erneut durch HCl Zugabe auf pH 3

gebracht, abzentrifugiert und in 200 ml 50 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert.

Beispiel 5

5 Nanopartikel bestehend aus einem Copolymer aus 95% Polyacrylnitril und 5% Polyacrylsäure und $[\text{Ru}(\text{dph phen})_3]^{2+}$

2 g Acrylnitril-Acrylsäure 20:1 Copolymer und 40 mg $\text{Ru}(\text{dphphen})_3\text{TMS}_2$ werden in 400 g DMF gelöst. Unter Rühren wird 1 l 10^{-3} N NaOH
10 zugetropft und mit Wasser auf 2 l aufgefüllt. Die klare Suspension wird mit 0,1 N HCl auf pH 3 gebracht und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zentrifugat wird 3 mal mit je 1,8 l Wasser gewaschen und in 200 ml 50 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert. Die klare Suspension wird 20 min auf ca 80°C erwärmt
15 und nach dem Abkühlen erneut durch HCl Zugabe auf pH 3 gebracht, abzentrifugiert und in 200 ml 50 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert.

Beispiel 6

20 Nanopartikel bestehend aus einem Copolymer aus 99,5% Polyacrylnitril und 0,5% Polyacrylamin und $[\text{Ru}(\text{dph phen})_3]^{2+}$

0.5 g Acrylnitril – 3-Aminopropylacrylamid - 200:1 Copolymer und 10 mg $\text{Ru}(\text{dphphen})_3\text{TMS}_2$ werden in 100 g DMF gelöst. Unter Rühren wird
25 0.5 l 10^{-3} N HCl zugetropft und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die klare Suspension wird mit 0,1 N NaOH auf pH 9 gebracht und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zentrifugat wird 3 mal mit je 1 l Wasser gewaschen und in 50 ml Wasser mittels Ultraschall resuspendiert. Die Suspension wird 20 min auf ca 80°C erwärmt und
30 nach dem Abkühlen 2 mal mit Wasser gewaschen und resuspendiert.

Beispiel 7

- 15 -

Nanopartikel bestehend aus einem Copolymer aus 90% Polyacrylnitril und 5% Polyacrylsäure und 5% Polyethylenglycolmonoethyletheracrylat und $[\text{Ru}(\text{dph phen})_3]^{2+}$

- 5 0.5 g Acrylnitril-Acrylsäure-Polyethylenglycolmonomethyletheracrylat 20:1:1 Copolymer und 5 mg $\text{Ru}(\text{dphphen})_3\text{TMS}_2$ werden in 200 g DMF gelöst. Unter Rühren wird 1 l 10^{-3} N NaOH zugetropft. Die klare Suspension wird mit 0.1 N HCl auf pH 3 gebracht und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zentrifugat wird 3 mal mit je 1 l
- 10 Wasser gewaschen und in 1 l 100 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert. Die klare Suspension wird durch HCl Zugabe auf pH 3 gebracht, abzentrifugiert und in 200 ml 100 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert. Die klare Suspension wird 20 min auf ca 80°C erwärmt und nach dem Abkühlen erneut durch HCl Zugabe auf pH 3
- 15 gebracht, abzentrifugiert und in 200 ml 50 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert.

Beispiel 8

Nanopartikel bestehend aus einem Copolymer aus 85% Polyacrylnitril,

20 5% Polyacrylsäure und 10 % Polysulfoacrylat und $[\text{Ru}(\text{dph phen})_3]^{2+}$

- 0.5 g Acrylnitril-Acrylsäure-Sulfopropylacrylat 20:1:2 Copolymer und 50 mg $\text{Ru}(\text{dphphen})_3\text{Cl}_2$ werden in 100 g DMF gelöst. Unter Rühren wird 0.5 l 10^{-3} N NaOH zugetropft. Die klare Suspension wird mit 0.1 N HCl auf
- 25 pH 3 gebracht und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zentrifugat wird 3 mal mit je 1 l Wasser gewaschen und in 100 ml 50 mM Na_2HPO_4 mittels Ultraschall resuspendiert. Die klare Suspension wird 20 min auf ca 80°C erwärmt und nach dem Abkühlen erneut durch HCl Zugabe auf pH 3 gebracht abzentrifugiert und in 100 ml 50 mM Na_2HPO_4
- 30 mittels Ultraschall resuspendiert.

Beispiel 9

**Charakterisierung von lumineszierenden Partikeln auf Basis von
Polyacrylnitril oder Polyacrylnitril-Copolymeren**

s Die aufgelisteten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 20 bis
100 nm und dem Lumineszenzfarbstoff Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-
1,10-phenanthrolin wurden bei 20°C in einem 20 mM Phosphatpuffer
(pH 7) vermessen. Die Nanopartikel waren in einer Probe dispergiert. Die
Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle I dargestellt.

Tabelle 1: Charakterisierung von verschiedenen phosphoreszierenden Nanopartikeln auf der Basis von Polyacrylnitrilpartikeln

(Durchmesser der gelisteten Partikel (20-100 nm) Farbstoff in allen Fällen: der Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-komplex
Alle Messungen wurden bei 20°C in einem 20 mM Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführt. Die Nanopartikel waren in der Probe dispergiert.

Sensor	Grundmonomer (= Acrylnitril) [% (w/w)]	Co-monomer(e) [% (w/w)]	Luftgesättigt relative Phosphoreszenz- intensität I	Abklingzeit [µs]	<i>N₂</i> - gesättigt Abklingzeit [µs]	Sauerstofflöschung (Abnahme der Abklingzeit zwischen 0 und 200 hPa pO ₂) in %
Farbstoff gelöst in Wasser	-	-	12	0.90	4.40	85
1 (Bsp. 1)	100.0	-	0.0	23.81	5.69	8.2
2..	90.0	Acrylsäure	10.0	26.00	6.10	4.1
3	87.0	Acrylsäure	13.0	19.81	5.55	10.0
4	76.9	Acrylsäure	23.1	18.07	5.89	0.3
5 (Bsp.5)	95.0	Acrylsäure	5.0	15.24	5.78	5.4
6	95.0	Ethylenglykolmo noethyl etheracryl at	5.0	19.36	6.01	3.7

Fortsetzung der Tabelle I

7 (Bsp.7)	90.0	Acrylsäure, 5.0, Ethylenglykolmo 5.0 noethyletheracryl at	17.23	5.38	5.94	9.4
8	83.4	Acrylsäure, 8.3, Ethylenglykolmo 8.3 noethyletheracryl at	19.46	6.00	6.16	2.6
9 (Bsp.8)	87.0	Acrylsäure, 4.3, Acrylsulfonäure 8.7	16.05	5.36	5.98	10.4
10	95.0	primäres Acrylamin (Ester, -CO(CH ₂) ₂ NH ₂)	25.11	5.59	5.96	6.2
11	90.0	primäres Acrylamin (Ester, -CO(CH ₂) ₂ NH ₂)	18.64	5.75	5.82	1.2
12 (Bsp.6)	99.5	primäres Acrylamin (Amin, -NH(CH ₂) ₂ NH ₂)	16.52	5.27	5.90	10.7

Ansprüche

1. Lumineszierende Mikro- und Nanopartikel,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie lumineszierende Substanzen mit langen
Lumineszenzabklingzeiten enthalten und wobei die
lumineszierenden Substanzen gegenüber chemischen und
biochemischen Parametern der Umgebung im Wesentlichen
abgeschirmt sind.
2. Partikel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine oder mehrere Lumineszenzeigenschaften der
lumineszierenden Substanzen, insbesondere ausgewählt aus
Quantenausbeute, spektraler Charakteristik,
Lumineszenzabklingzeit und Anisotropie von der jeweiligen
Umgebung im Wesentlichen unabhängig sind.
3. Partikel nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um Metall-
Liganden-Komplexe von Ruthenium(II), Osmium(II) Rhenium(I),
Iridium(III) Platin(II) und Palladium(II) als Zentralatom handelt.
4. Partikel nach Anspruche 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um Komplexe
mit 2 oder 3-zähnigen Polypyridylliganden wie 2,2'-Bipyridin,
Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridyl oder deren Abkömmlingen als
Liganden handelt.

5. Partikel nach einem der Ansprüche 3 - 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um die
Triskomplexe von Ruthenium(II) mit 2,2'-Bipyridyl, 1,10-
5 Phenanthrolin, 4,4-Diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-Diphenyl-1,10-
phenanthrolin als Liganden handelt.

6. Partikel nach Anspruche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um
Carbonylkomplexe von Re(II) mit zusätzlichen Diiminliganden wie
Abkömmlingen von 2,2'-Bipyridyl und 1,10-Phenanthrolin handelt.

7. Partikel nach Anspruch 1 oder 2,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um
Porphyrinkomplexe von Pt(II) sowie Pd(II) als Zentralatom handelt.

8. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 7,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein organisches Polymer enthalten, das sich durch geringe
Wasseraufnahme oder/und minimale Gaspermeabilität auszeichnet.

9. Partikel nach Anspruch 8,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein organisches Polymer aus der Gruppe der
Polyacrylnitrile, Poly(meth)acrylcopolymere, Polyvinylchloride oder
Polyvinylidenchloride und Copolymere davon enthalten.

10. Partikel nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie Polyacrylnitril oder Polyacrylnitril-Copolymere,
insbesondere Copolymere mit Acrylsäure, Acrylaminen oder/und
Acrylestern enthalten.
11. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Glas enthalten, das im Wesentlichen frei von
Mikroporen ist.
12. Partikel nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Glas enthalten, das nach einem Sol-Gel-Verfahren
hergestellt worden ist.
13. Partikel nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Sol-Gel Glas enthalten, das aus Silizium-, Titan-,
Zirkonium- oder/und Zinn-tetraalkoholaten hergestellt worden ist.
14. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass ihre Oberfläche durch reaktive Gruppen wie Amino-, Epoxy-,
Hydroxy-, Thiol- oder/und Carboxylgruppen modifiziert ist, welche
die kovalente Kopplung von Lumineszenzindikatoren oder/und
Biomolekülen ermöglichen.
15. Partikel nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie an ihrer Oberfläche kovalent gekoppelt
Lumineszenzindikatoren oder/und Biomoleküle enthalten.

16. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die Partikel aus einer Polymerlösung, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt, durch Zutropfen einer Flüssigkeit ausgefällt werden, wobei die Flüssigkeit mit dem Polymerlösungsmittel mischbar ist, jedoch eine Verringerung der Löslichkeit des Polymers bewirkt.
17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Partikel aus einer Lösung bestehend aus Dimethylformamid und Polyacrylnitril oder Polyacrylnitril-Copolymer, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser oder einer wässrigen Lösung ausgefällt werden.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Lösung eingestellt wird.
19. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die lumineszierende Verbindung in bereits vorgefertigte Partikel aus einem Lösungsmittel(gemisch) durch Diffusion eingebaut wird.
20. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die Partikel durch Versprühen einer Polymerlösung, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt und Verdampfung des Lösungsmittels entstehen.
21. Verfahren nach Anspruch 20 wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Sprühlösung eingestellt wird.

- 23 -

22. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 11 - 13, wobei die lumineszierende Verbindung in verdichtete monolithische Sol-Gel Gläser eingebaut wird, welche anschließend gemahlen und nach Größe fraktioniert werden.
23. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 - 14 zur Markierung und lumineszenzoptischen Detektion von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien.
24. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 - 14 als Standards zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen in fluorimetrischen Assays.
25. Verwendung nach Anspruch 23, wobei durch die Zugabe des Standards zur Probe die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder/und einen zeitabhängigen Parameter konvertiert wird.
26. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 - 14 zur Referenzierung des Lumineszenzintensitätssignals von optischen Lumineszenzsensoren, wobei die Partikel mit einem Lumineszenzindikator in einer festen Phase gemeinsam immobilisiert werden.
27. Verfahren zur lumineszenzoptischen Bestimmung eines biochemischen oder chemischen Parameters unter Verwendung zweier verschiedener Lumineszenzfarbstoffe, die unterschiedliche Abklingzeiten aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der

- 24 -

sich ergebenden Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße für die Bestimmung des Parameters verwendet wird, wobei der erste Lumineszenzfarbstoff zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und der zweite zumindest in der Lumineszenzintensität und der Lumineszenzabklingzeit nicht auf den Parameter anspricht, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Lumineszenzfarbstoff in Form von Partikeln nach einem der Ansprüche 1 - 15 eingesetzt wird.

(12) NACH DEM ÜBERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/06227 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/58, 33/96

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06832

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Juli 2000 (17.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 33 104.9 15. Juli 1999 (15.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PRESENS PRECISION SENSING GMBH [DE/DE]; Spitalplatz c 191, D-86633 Neuburg a.d. Donau (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLIMANT, Ingo [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Strasse 32, D-93051 Regensburg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit geänderten Ansprüchen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 19. Juli 2001

Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche:
16. August 2001

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PRODUCTION AND USE OF LUMINESCENT MICROPARTICLES AND NANOPARTICLES

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG UND ANWENDUNG VON LUMINESZIERENDEN MIKRO- UND NANOPARTIKELN

(57) Abstract: The invention relates to the composition, production and use of luminescent microparticles and nanoparticles. These particles can either be used as internal standards for referencing fluorescence signals, or as markers for marking and detecting biomolecules. Luminescence dyes are incorporated, in inert form, into solid materials such that they are protected from the influence of chemical and biological compounds in aqueous sample constituents. In this incorporated form, the photophysical characteristics of the dyes (spectral characteristic, luminescence quantum efficiency, luminescence fading time and polarization) remain unaffected by sample parameters that vary. Compact inorganic materials or organic polymers are selected, in particular, as an incorporating matrix which, due to their structure, do not receive biomolecules, small neutral molecules as well as ionic compounds. In particular, the interfering influence of molecular oxygen, of an efficient luminescence quencher, on luminescence measurements is eliminated in this manner. The surface of the nanoparticles and microparticles can be provided with reactive surfaces in order to enable covalent coupling of biochemicals or to eliminate the aggregation of the particles.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln. Diese Partikel können entweder als interne Standards zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, oder als Marker zur Markierung und Detektion von Biomolekülen verwendet werden. Lumineszenzfarbstoffe werden in inerte Form in feste Materialien eingebaut, das heisst vom Einfluss von chemischen und biologischen Verbindungen in wässrigen Probenbestandteilen abgeschirmt. In dieser eingebauten Form bleiben die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe (spektrale Charakteristik, Lumineszenzquantenausbeute, Lumineszenzabklingzeit und Polarisation) von wechselnden Probenparametern unbeeinflusst. Als Einbaumatrix werden insbesondere dichte anorganische Materialien oder organische Polymere ausgewählt, die aufgrund ihrer Struktur die Aufnahme von Biomolekülen, kleinen neutralen Molekülen sowie ionischen Verbindungen ausschliessen. Insbesondere der störende Einfluss von molekularem Sauerstoff, einem effizienten Lumineszenzlöcher, auf Lumineszenzmessungen wird auf diese Weise eliminiert. Die Oberfläche der Nano- und Mikropartikel kann mit reaktiven Oberflächen versehen sein, um die kovalente Kopplung von Biomolekülen zu ermöglichen bzw. das Aggregieren der Partikel zu eliminieren.

WO 01/06227 A3



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 24. Februar 2001 (24.02.01) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1-27 durch geänderte Ansprüche 1-27 ersetzt (6 Seiten)]

1. Lumineszierende Mikro- und Nanopartikel,
5 dadurch gekennzeichnet,
 dass sie lumineszierende Substanzen mit langen
 Lumineszenzabklingzeiten enthalten und wobei die
 lumineszierenden Substanzen gegenüber chemischen und
 biochemischen Parametern der Umgebung im Wesentlichen
10 gasundurchlässig abgeschirmt sind.

2. Partikel nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass eine oder mehrere Lumineszenzeigenschaften der
15 lumineszierenden Substanzen, insbesondere ausgewählt aus
 Quantenausbeute, spektraler Charakteristik,
 Lumineszenzabklingzeit und Anisotropie von der jeweiligen
 Umgebung im Wesentlichen unabhängig sind.

- 20 3. Partikel nach Anspruch 1 oder 2,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um Metall-
 Liganden-Komplexe von Ruthenium(II), Osmium(II) Rhenium(I),
 Iridium(III) Platin(II) und Palladium(II) als Zentralatom handelt.
25

4. Partikel nach Anspruche 3,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um Komplexe
 mit 2 oder 3-zähligen Polypyridylliganden wie 2,2'-Bipyridin,
30 Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridyl oder deren Abkömmlingen als
 Liganden handelt.

5. Partikel nach einem der Ansprüche 3 - 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um die
Triskomplexe von Ruthenium(II) mit 2,2'-Bipyridyl, 1,10-
Phenanthrolin, 4,4-Diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-Diphenyl-1,10-
phenanthrolin als Liganden handelt.
6. Partikel nach Anspruche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Substanzen um
Carbonylkomplexe von Re(I) mit zusätzlichen Diiminliganden wie
Abkömmlingen von 2,2'-Bipyridyl und 1,10-Phenanthrolin handelt.
7. Partikel nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um
Porphyrinkomplexe von Pt(II) sowie Pd(II) als Zentralatom handelt.
8. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein organisches Polymer enthalten, das sich durch geringe
Wasseraufnahme oder/und minimale Gaspermeabilität auszeichnet.
9. Partikel nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein organisches Polymer aus der Gruppe der
Polyacrylnitrile, Poly(meth)acrylcopolymere, Polyvinylchloride oder
Polyvinylidenchloride und Copolymere davon enthalten.

10. Partikel nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie Polyacrylnitril oder Polyacrylnitril-Copolymere,
insbesondere Copolymere mit Acrylsäure, Acrylaminen oder/und
Acrylestern enthalten.
11. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Glas enthalten, das im Wesentlichen frei von
Mikroporen ist.
12. Partikel nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Glas enthalten, das nach einem Sol-Gel-Verfahren
hergestellt worden ist.
13. Partikel nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie ein Sol-Gel Glas enthalten, das aus Silizium-, Titan-,
Zirkonium- oder/und Zinn-tetraalkoholaten hergestellt worden ist.
14. Partikel nach einem der Ansprüche 1 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass ihre Oberfläche durch reaktive Gruppen wie Amino-, Epoxy-,
Hydroxy-, Thiol- oder/und Carboxylgruppen modifiziert ist, welche
die kovalente Kopplung von Lumineszenzindikatoren oder/und
Biomolekülen ermöglichen.
15. Partikel nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie an ihrer Oberfläche kovalent gekoppelt
Lumineszenzindikatoren oder/und Biomoleküle enthalten.

16. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die Partikel aus einer Polymerlösung, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt, durch Zutropfen einer Flüssigkeit ausgefällt werden, wobei die Flüssigkeit mit dem Polymerlösungsmittel mischbar ist, jedoch eine Verringerung der Löslichkeit des Polymers bewirkt.
17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Partikel aus einer Lösung bestehend aus Dimethylformamid und Polyacrylnitril oder Polyacrylnitril-Copolymer, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser oder einer wässrigen Lösung ausgefällt werden.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Lösung eingestellt wird.
19. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die lumineszierende Verbindung in bereits vorgefertigte Partikel aus einem Lösungsmittel(gemisch) durch Diffusion eingebaut wird.
20. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei die Partikel durch Versprühen einer Polymerlösung, in welcher die lumineszierende Verbindung gelöst vorliegt und Verdampfung des Lösungsmittels entstehen.
21. Verfahren nach Anspruch 20 wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Sprühlösung eingestellt wird.

22. Verfahren zur Herstellung von lumineszierenden Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 11 - 13, wobei die lumineszierende Verbindung in verdichtete monolithische Sol-Gel Gläser eingebaut wird, welche anschließend gemahlen und nach Größe fraktioniert werden.
23. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 - 14 zur Markierung und lumineszenzoptischen Detektion von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien.
24. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüchen 1 - 14 als Standards zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen in fluorimetrischen Assays.
25. Verwendung nach Anspruch 23, wobei durch die Zugabe des Standards zur Probe die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder/und einen zeitabhängigen Parameter konvertiert wird.
26. Verwendung der lumineszierenden Mikro- und Nanopartikel nach einem der Ansprüche 1 - 14 zur Referenzierung des Lumineszenzintensitätssignals von optischen Lumineszenzsensoren, wobei die Partikel mit einem Lumineszenzindikator in einer festen Phase gemeinsam immobilisiert werden.
27. Verfahren zur lumineszenzoptischen Bestimmung eines biochemischen oder chemischen Parameters unter Verwendung zweier verschiedener Lumineszenzfarbstoffe, die unterschiedliche Abklingzeiten aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der

sich ergebenden Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße für die Bestimmung des Parameters verwendet wird, wobei der erste Lumineszenzfarbstoff zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und der zweite zumindest in der Lumineszenzintensität und der Lumineszenzabklingzeit nicht auf den Parameter anspricht, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Lumineszenzfarbstoff in Form von Partikeln nach einem der Ansprüche 1 - 15 eingesetzt wird.